

VU Research Portal

The evolutionary loss of lipogenesis in insect parasitoids

Lammers, M.

2020

document version

Publisher's PDF, also known as Version of record

[Link to publication in VU Research Portal](#)

citation for published version (APA)

Lammers, M. (2020). *The evolutionary loss of lipogenesis in insect parasitoids: Molecular mechanisms and ecological aspects*. [PhD-Thesis - Research and graduation internal, Vrije Universiteit Amsterdam].

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

E-mail address:

vuresearchportal.ub@vu.nl

The background features a series of stylized, overlapping hills in various shades of gray, creating a sense of depth and movement. Scattered across the scene are several small, dark silhouettes of flying insects, possibly bees or flies, adding a naturalistic touch to the abstract landscape.

Samenvatting

Samenvatting

Het verlies van eigenschappen is een veelvoorkomend fenomeen in de evolutie van alle levensvormen. De casus bestudeerd in dit proefschrift is het onvermogen van het overgrote merendeel van parasitoïde insecten om suiker uit voeding om te zetten in vetten. Dit metabolische proces heet lipogenese, vetaanmaak, of *de novo* verzuursynthese. Het verlies van lipogenese in parasitoïden is verrassend, aangezien vetten essentiële functies hebben in ieder organisme, bijvoorbeeld in de energieopslag, als de bouwblokken van celmembranen en als voorlopers van signaalmoleculen zoals sterolen. Terwijl andere soorten, inclusief de voorouders van parasitoïden, lipogenese aangehouden hebben, is er meermaals een samenloop van een overgang op de parasitoïde levensstijl en het ontbreken van vetaanmaak in meerdere onafhankelijke gelegenheden in kevers, vliegen en in meerdere superfamilies binnen de Hymenoptera. Net als ieder ander organisme hebben ook parasitoïden een behoefte aan vetten, maar in plaats van vetten zelf aan te maken, verkrijgen ze de vetten van hun gastheer.

Een belangrijke stap in het begrijpen van de oorzaken van het krijgen en verliezen van eigenschappen, is het achterhalen van het onderliggende moleculaire mechanisme van specifieke evoluerende eigenschappen. Alhoewel het verlies van eigenschappen veel voorkomt in evolutie, is de onderliggende moleculaire oorzaak bekend in slechts een handvol gevallen. In de meeste van deze gevallen ligt de oorzaak in mutaties die functieverlies geven in een of enkele eigenschapsspecifieke genen, een proces dat bekend staat als gendegradatie. Echter, in parasitoïde insecten is het evolutionaire verlies van lipogenese niet geassocieerd met gendegradatie. Ik heb het gebrek aan vetaanmaak bestudeerd in de modelsluipwesp *Nasonia vitripennis*. In dit proefschrift zijn er zes hoofdstukken, elk gericht op verschillende aspecten van het evolutionaire verlies van lipogenese. In vier van deze hoofdstukken heb ik moleculaire, experimentele en computationele methoden gebruikt om te onderzoeken welke proximale factoren het verlies van vetaanmaak onderliggen. In deze hoofdstukken krijgen de genen *acc* en *fas* bijzondere aandacht, aangezien verzuursynthese verzorgd wordt door de enzymen Acetyl-CoA Carboxylase (in het genoom gecodeerd door het gen *acc*) en Fatty Acid Synthase (gecodeerd door *fas*). In twee aanvullende hoofdstukken maak ik gebruik van de beschikbare kennis over de natuurlijke historie van insecten voor het ontwerp en de uitvoering van experimenten met het doel enkele ultieme factoren met betrekking tot de oorzaken en consequenties van het verlies van vetaanmaak in parasitoïde insecten op te helderen.

Omdat voorgaande onderzoekers gesuggereerd hebben dat het verlies van vetaanmaak in de sluipwesp *N. vitripennis* veroorzaakt kan zijn door veranderingen in genregulatie, begon ik met het bestuderen van de verschillen in genexpressieprofielen die teweeggebracht worden door het eten van suikers. In hoofdstuk 2 van dit proefschrift stel ik de vraag: Welke verschil-

len in de transcriptomen van *N. vitripennis* worden veroorzaakt door het eten van sucrose en hoe verschilt dit patroon van de lipogene fruitvlieg *Drosophila melanogaster*? De genoombrede transcriptionele veranderingen werden gemeten door middel van RNAseq en vergeleken tussen behandelingen en tussen soorten. Het doel was verkennend, gericht op het beschrijven van transcriptionele veranderingen en daarbij helpend in het formuleren van specifieke hypothesen over de regulerende mechanismen die onder het evolutionaire verlies van vetaanmaak verscholen liggen. Na het eten van suiker stemden beide soorten op consistente wijze over de replica's hun metabolisme binnen vier uur bij, maar er waren uitgesproken verschillen tussen de expressieprofielen van beide soorten. Deze verschillen waren het sterkst voor de genen die betrokken zijn bij het metaboliseren van koolhydraten en vetten: *D. melanogaster* verhoogde de transcriptie van de genen die betrokken zijn bij lipogenese, terwijl *N. vitripennis* dat niet deed. Bovendien verschilde de expressie van enkele genen die coderen voor kernenzymen in het acetyl-CoA metabolisme, zoals *malonyl-CoA decarboxylase* (*mcd*) en *HMG-CoA synthase* (*hmgs*). Er was een significante correlatie tussen gepubliceerde benaderingen van genconnectiviteit en de waargenomen veranderingen in genexpressie. De gevonden hoge connectiviteit van lipogenese-genen duidt op pleiotrope effecten en dit zou een verklaring kunnen zijn voor de afwezigheid van gendegradatie in deze verlorenegegaande eigenschap. Het hoofdstuk sluit af met de hypothese dat de bijstelling van enkele laagverbonden genen, zoals *mcd* en genen betrokken bij ketogenese, genoeg zijn om vetzuursynthese te blokkeren zonder negatieve invloed op andere gekoppelde metabole processen.

In hoofdstuk 3 wordt deze hypothese getest met de vraag: Kan het ondermijnen van kandidaatgenen een verandering teweeg brengen in het lipogenese-fenotype? Met behulp van RNA-gemedieerde interferentie tegen vijf sleutelgenen uit de vetzuursynthese (*fas1*, *fas2*, *fas3*, *acc*, and *mcd*) in *N. vitripennis* bestudeerde ik hoe genexpressieniveaus het verlies van vetaanmaak beïnvloeden. De genexpressieniveaus van deze genen en vijf aanvullende genen die van belang zijn voor de regulatie van vetzuursynthese werden gepeild voor en na het eten van suiker. Omdat *fas* en *acc* hun voornaamste functie verloren hebben, was de verwachting dat het uitschakelen van deze genen geen fenotypisch effect zou hebben, terwijl het uitschakelen van het kandidaatgen *mcd* lipogenese weer zou moeten activeren. Ik vond een significante positieve relatie tussen de centraliteit van het ondermijnende gen in het netwerk en de mate van bijkomende genexpressieveranderingen in andere genen. Al met al was het lipogenese-fenotype robuust tegen veranderingen in netwerkonderdelen door RNAi. In de controlegroep en in alle behandelingen was het vetgehalte van sluipwespen na een week voeden lager dan tijdens uitsluipen, een bevinding die consistent is met het beschreven gebrek aan vetaanmaak in deze soort. Echter, het uitschakelen van *acc* remt de mate van vetverlies ten opzichte van de controlegroep. Al met al bleek dat het verlagen van de activiteit van geen van de vijf sleutelgenen de lipogenese heractiveerde.

De volgende twee hoofdstukken onderzoeken de regulerende componenten van de verzuur-synthesegenen. In hoofdstuk 4 worden de regulerende mechanismen van de sleutelenzymen van het verzuurmetabolisme bestudeerd. De meeste mutaties van genregulerende mechanismen, zowel van de regulatietypen *cis* als *trans*, delen de promotor van de centrale genen als doelwit. De centrale vraag van het hoofdstuk is: Zijn de promotors van sleutelgenen in de vetzuursynthese functioneel in *N. vitripennis*? Deze sleutelgenen (*atp-cl*, *acc*, *fas* and *mcd*) zijn aanwezig in het genoom van *N. vitripennis* zonder kenmerken van gendegradatie. De verwachting is dat de promotors van deze genen verminderde activiteit vertonen, aangezien genexpressiepatronen in *N. vitripennis* afwijken van lipogene soorten. Luciferase-reportertests in normaal groeimedium en met verhoogde suikerconcentraties laten zien dat de promotors van alle genen van zowel *N. vitripennis* als *D. melanogaster* een waarneembare hoeveelheid luminiscentie produceren. Dit bevestigt functionaliteit van de promotors van deze sleutelgenen in *N. vitripennis*. Echter, de mate van luciferase-inductie door deze promotors varieert ten opzichte van de analoge promotors in *D. melanogaster*, maar met een ander patroon voor elk gen.

In hoofdstuk 5 vraag ik: Is het verlies van vetaanmaak epigenetisch gereguleerd via DNA-methylatie? Een eerder gebruikte methode van farmacologische manipulatie van DNA-methylatie met de verbinding 5-aza-2'-deoxycytidine (5-aza-dC) werd toegepast om de epigenetische regulatie van lipogenese te onderzoeken. Indien DNA-methylatie betrokken is bij het verlies van vetaanmaak, dan is de verwachting dat manipulatie van DNA-methylatie het vetgehalte van sluipwespen verandert. Met behulp van bisulfiet-amplicon-volgordebepaling (BSAS) van tien genen die ofwel zwaargemethyleerd zijn, of eerder variatie in methylatieniveau lieten zien, of gesuggereerd zijn epigenetisch gereguleerd te zijn, wordt aangetoond dat sluipwespen die 5-aza-dC in hun voeding hadden voor geen van deze loci verminderde DNA-methylatie hebben. Het hoofdstuk sluit af met de conclusie dat de gebruikte methode geen effect had op het DNA-methylatieniveau, terwijl tegelijkertijd een gering effect op het lipogenese-fenotype waargenomen werd: sluipwespen die 5-aza-dC door hun eten gemengd kregen hadden toegenomen vetverlies. Vanwege het inconsistente effect van 5-aza-dC op DNA-demethylatie is het niet aan te raden deze methode in toekomstige studies met betrekking tot het verband tussen DNA-methylatie en fenotypische eigenschappen in *N. vitripennis* toe te passen.

De volgende twee hoofdstukken richten zich op de ecologische aspecten van het gebrek aan vetaanmaak in parasitoïde insecten. In hoofdstuk 6 vraag ik mij af: Speelt de verwerving van vetten een rol in competitieve interacties? De ecologische consequenties van het verlies van vetaanmaak werden onderzocht door de nutritionele ecologie van de interactie tussen de inheemse *N. vitripennis* en geïntroduceerde *Tachinaephagus zealandicus* te bestuderen. Wanneer twee soorten niet-lipogene sluipwespen concurreren over dezelfde gastheer, dan is de verwachting dat vetten de voornaamste betwiste voedingsstof zijn. Terwijl van de voor-

genoemde soort al bekend was dat zij geen vetaanmaak vertoont, laat een eenvoudige test zien dat *T. zealandicus* ook afhankelijk is van de vetten uit de gastheer. In de competitie-experimenten werd ovipositie door *T. zealandicus* opgevolgd met multiparasitering door *N. vitripennis*. Het tijdsverschil tussen beide ovipositie-evenementen bleek de doorslaggevende factor voor competitieve superioriteit en begrenst het succes van de later-arriverende *N. vitripennis* in de verwerving van vetten. Een opvallende bevinding was dat *N. vitripennis* slechts 10% van haar potentiaal behaald op het laatste tijdstip. Dit begrenste succes van voortplanting door *N. vitripennis* werd bereikt door te hyperparasiteren op de volgroeide larven van *T. zealandicus*, een kunstje dat *N. vitripennis* een voordeel geeft aangezien dit het tijds kader verlengt waarop gastheren beschikbaar blijven voor parasitering. Keuze-experimenten met *N. vitripennis* waar gastheren die verschillende ontwikkelingsstadia van *T. zealandicus* bevatten werden aangeboden, toonden een gedeeltelijke discrepantie tussen het vermijden van competitie en de prestatie van de nakomelingen, wat een verband kan houden met de beperkte duur van co-evolutie tussen inheemse en geïntroduceerde soorten. Naast het uitsluipsucces van de nakomelingen werd de verwerving van vetten bestudeerd als het voornaamste ruilmiddel in de interactie. Door fitness (fitheid) te kwantificeren in verworven vetten ontdekte ik verschillen tussen behandelingen die anders gemist zouden zijn, bijvoorbeeld daar waar aantallen nakomelingen van *N. vitripennis* gelijk waren, of waar twee maten van fitness tegenovergestelde effecten aangeven.

Hoofdstuk 7 onderzoekt wat gebeurt wanneer de parasitoïde levensstijl zelf verloren gaat, en vraagt daarom: Kan het secundaire verlies van de parasitoïde levensstijl herwinning van vetaanmaak teweeg brengen? Omdat aangetoond is dat lipogenese een evolutionair labiele eigenschap is, werd verwacht dat lipogenese herwonnen zou worden in verscheidene groepen wespen die teruggekeerd zijn naar een fytofaag dieet. Ik testte hier of twee soorten zaadetende soorten die onafhankelijk van parasitoïde voorouders geëvolueerd zijn hun vermogen tot lipogenese herwonnen hebben. The larven van *Megastigmus aculeatus* (Hymenoptera: Chalcidoidea: Torymidae) en *Bruchophagus platypterus* (Hymenoptera: Chalcidoidea: Eurytomidae) voeden zich obligaat met de zaden van specifieke plantensoorten. De zaden van vrijlevende gastheerplanten werden verzameld en de uitsluitende wespen werden getest voor hun vermogen om vetten aan te maken door hun vetgehaltes te vergelijken tussen het moment kort na uitsluipen en na het weeklang eten van sucrose. Beide soorten slaagden er niet in hun vetgehalte te verhogen na een week *ad libitum* toegang tot suiker, wat duidt op een gebrek aan vetaanmaak. Deze ontdekking betekent dat de secundaire overstap op een fytofaag dieet niet geassocieerd is met herstel van lipogenese in deze soorten. Het lijkt erop dat de nauwe band tussen zaadetende insecten en hun gastheerplanten het mogelijk maakt voor de zaateters om te vertrouwen op een voorspelbare hoeveelheid vetten in hun dieet wat de noodzaak tot autonome vetzuursynthese verzacht.

Hoofdstuk 8 is een overkoepelende synthese waarin ik de resultaten en inzichten verkregen tijdens de uitvoering van dit promotietraject integreer. In dit hoofdstuk beëindig ik het proefschrift met conclusies over de belangrijkste bevindingen van deze studies en bovendien identificeer ik vragen voor toekomstig onderzoek. Verder bespreek ik de betekenis van mijn werk voor ons begrip van de evolutie van eigenschappen in het algemeen en voor onze kennis van het insectenmetabolisme in het bijzonder. Terugblikkend op de belangrijkste resultaten concludeer ik dat in *N. vitripennis* geen van de sleutelgenen in de lipogenese zelf, noch hun promoters gedegradieerd zijn en dat al deze genen voldoende tot expressie komen voor functionele *de novo* vetzuursynthese. Paradoxaal genoeg is er geen waarneembare lipogenese in volwassen sluipwespen, wat het gevolg kan zijn van de hoge expressie van *malonyl-CoA decarboxylase*, mogelijk gekoppeld met andere transcriptionele veranderingen. Met betrekking tot de ecologische aspecten van lipogenese concludeer ik dat vetten betwist worden in de competitie tussen soorten over voedingsstoffen uit de gastheer. Ondanks dergelijke kosten blijkt dat lipogenese niet herwonnen wordt na een secundair verlies van de parasitoïde levensstijl in zaadetende wespen. Alles tezamen blijven insecten en in het bijzonder de evolutionaire patronen van verliezen en krijgen van vetaanmaak een fascinerend onderwerp voor toekomstig wetenschappelijk onderzoek.

